



## МЕТОДЫ АНАЛИЗА

### ФАРМАКОПЕЙНЫЕ МЕТОДЫ ПРОВЕДЕНИЯ АНАЛИЗА

Правила проведения ЛАЛ-теста регламентируются Общей Фармакопейной Статьей «Бактериальные эндотоксины» (ГФ XII стр.128). В части, касающейся правил проведения основного метода, гель-тромб теста, эта статья полностью соответствует правилам, описанным в Европейской Фармакопее и Фармакопее США. В настоящее время согласно фармакопейным требованиям разрешается проведение анализа шестью различными методами, каждый из них может быть использован для проведения контрольных анализов:

*Метод А. Качественный гель-тромб тест*

*Метод В. Количественный гель-тромб тест*

*Метод С. Кинетический турбидиметрический тест*

*Метод D. Кинетический хромогенный тест*

*Метод E. Хромогенный тест по конечной точке*

*Метод F. Турбидиметрический тест по конечной точке.*



**Метод А. Качественный гель-тромб тест.** Это наиболее простой и экономичный метод проведения анализа. Для его постановки смешивают равные количества ЛАЛ-реактива и испытуемого препарата, и реакционные смеси инкубируют 60 мин при температуре 37°C. Если в результате реакции получается твердый гель, результат называется положительным и означает, что концентрация эндотоксина равна или более чувствительности ЛАЛ-реактива. Если гель не образуется, результат отрицательный, и это означает, что концентрация эндотоксина менее чувствительности ЛАЛ-реактива. Достоинствами этого анализа являются простота проведения, минимум необходимого оборудования, хорошая воспроизводимость результатов. Ограничением метода является невозможность количественного определения концентрации эндотоксинов.

**Метод В. Количественный гель-тромб тест.** Для определения концентрации эндотоксина препарат последовательно разводят водой. Исходная концентрация эндотоксина в препарате постепенно снижается и, наконец, становится меньше чувствительности ЛАЛ-реактива. В опыте все разведения, в которых концентрация эндотоксина больше или равна чувствительности ЛАЛ-реактива, дают твердый гель, разведения, в которых концентрация ниже, дают отрицательные результаты. Наименьшее из разведений, в котором получен твердый гель, называют конечной точкой реакции. Для расчета концентрации эндотоксинов фактор этого разведения умножают на значение чувствительности ЛАЛ-реактива. Точность определения содержания эндотоксина этим методом не очень высокая. Допустимая ошибка метода составляет 50-200% от определенной величины. Т.е. реальная концентрация эндотоксинов в препарате может быть вдвое больше или вдвое меньше определенного в анализе значения. Поэтому в Европейской фармакопее **Метод В** называется полуколичественным анализом. Несмотря на эти ограничения, количественный гель-тромб тест достаточно широко используется в научно-исследовательских работах.

**Метод С. Кинетический турбидиметрический тест.** В этом анализе важным является скорость изменения оптической плотности реакционной смеси. Измерения проводятся до момента достижения заранее определенного (порогового) значения оптической плотности. Для проведения такой реакции необходимы приборы, в которых возможно одновременно инкубировать

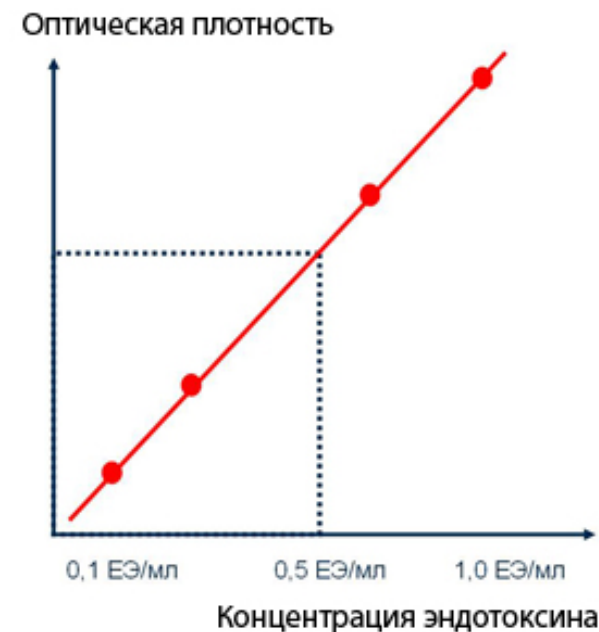
реакционные смеси и измерять их оптическую плотность. Измеряемый диапазон концентраций кинетического турбидиметрического метода очень широк: от 0,001 ЕЭ/мл до 100 ЕЭ/мл. Функции измерения выполняет прибор, например, фотометр для микропланшет, полученные данные обрабатываются специальными компьютерными программами. Фактически для проведения анализа используется сложный комплекс, состоящий из спектрофотометра, компьютера с принтером и программного обеспечения. К достоинствам метода можно отнести очень широкий диапазон измерений и высокую чувствительность. Программное обеспечение позволяет автоматизировать процедуру оценки и интерпретации результатов, программа автоматически генерирует протоколы анализа. Однако первоначальное освоение метода и программного обеспечения представляется несколько более сложным делом, чем освоение геля-тромб теста.

**Метод D. Кинетический хромогенный тест.** Кинетический хромогенный тест очень похож на турбидиметрический анализ с той разницей, что для его проведения используется специальный ЛАЛ-реактив с хромогенным субстратом. Измеряется интенсивность окрашивания реакционной смеси. Чем выше концентрация эндотоксина, тем быстрее идет реакция, и тем меньше надо времени, чтобы оптическая плотность достигла предопределенного порогового значения. Оптическая плотность реакционной смеси измеряется при длине волны 405 нм. Анализ практически всегда проводится на микропланшетах, в этом случае используется спектрофотометр Bio-Tek ELx808 или аналогичный. Для учета и обработки результатов необходимо программное обеспечение. К достоинствам метода можно отнести широкий диапазон измеряемых в анализе концентраций, высокую чувствительность к эндотоксинам, хорошие возможности автоматизации процедуры проведения анализа и обработки результатов, связанные с использованием специализированного оборудования и программ.

**Метод E. Хромогенный тест по конечной точке.** Для проведения этого анализа также используется ЛАЛ-реактив с искусственным хромогенным субстратом. Этот субстрат состоит из полипептидной цепочки и хромофора р-нитроанилина (рНА).

Структура хромогенного субстрата BOC-Leu-Gly-Arg-CONH- $\hat{A}$ -NO<sub>2</sub>

Аминокислотная последовательность полипептида аналогична аминокислотной последовательности коагулогена, предшествующей разрезаемой свертывающим ферментом связи. Поэтому активный свертывающий фермент «по ошибке» разрезает эту связь, высвобождая хромофор р-нитроанилин, в результате чего в растворе развивается желтое окрашивание. Реакцию можно принудительно остановить. Это означает, что инкубирование и измерение оптической плотности может быть проведено на разном оборудовании, и для проведения измерения необязательно использование сложных приборов, оснащенных модулем инкубирования. К достоинствам метода можно отнести и простую процедуру оценки результатов. В то же время анализ сложен в проведении и складывается из нескольких этапов, жестко регламентированных по времени и связанных между собой.



Калибровочная кривая и ее использование для определения концентрации эндотоксинов

**Метод F. Турбидиметрический тест по конечной точке.** В этом анализе проводится измерение степени помутнения реакционной смеси после инкубирования. Степень помутнения реакционной смеси прямо пропорциональна активности свертывающего фермента и, соответственно, содержанию эндотоксинов. Для оценки степени помутнения используются фотометры для микропланшет или пробирок. Измерения делают при длине волны 405 нм (350 нм). Калибровочная кривая строится по трем-четырем известным концентрациям КСЭ. Измерения возможны в ограниченном диапазоне концентраций эндотоксина. Метод не получил широкого распространения, поскольку реакцию невозможно остановить, и проводить такой анализ можно только на приборах, позволяющих одновременно инкубировать реакционные смеси и проводить измерения оптической плотности. Однако в этом случае целесообразнее использовать кинетический турбидиметрический метод (Метод С) см. выше.

© 2012. НПО «ЛАЛ-ЦЕНТР» г. Москва  
Тел.: +7(925) 517-40-37,  
Тел/факс: +7(495) 223-07-29,  
E-mail: [lalnews@limulustest.ru](mailto:lalnews@limulustest.ru)

Создание сайта : Мейкус-Сервис.